

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593158

研究課題名(和文) 歯周病原因子とアディポカインの相互作用が血管内皮細胞や肝細胞に与える影響

研究課題名(英文) The influence by which the interaction with Adipokine and periodontitis gives to vascular endothelial cell and hepatocyte

研究代表者

古堅 麗子 (FURUGEN, Reiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：90253674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の進行に関与する分子の1つであるPentraxin3 (PTX3)は、炎症刺激で、血管内皮細胞やマクロファージなどから直接産生される。本研究では、ヒト単球系細胞において、*Porphyromonas gingivalis* (Pg)由来LPSによる刺激によりPTX3産生が確認できたことより、歯周病における炎症が動脈硬化に影響を与えることが考えられた。さらに高血糖状態でPTX3発現が上昇したことは、歯周病による炎症と全身疾患の相互作用を示唆するものである。本研究ではさらに、肝細胞や血管内皮細胞においても同様の研究を進行中である。

研究成果の概要(英文)：Pentraxin3 is one of the elements which participate in progress of atherosclerosis is produced directly from vascular endothelial cell and macrophage by an inflammatory stimulus. It was considered that periodontal inflammation could influenced on atherosclerosis, because of PTX3 production by pg-LPS stimulation in human monocytic cells. In addition to pg-LPS challenge, hyperglycemia have an effect on the expression of pentraxin3. It suggested that periodontal inflammation may affect systemic disease.

研究分野：社会系歯学

キーワード：歯周病 アディポカイン

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞が産生するアディポカインは数多く報告されているが、その1つであるレジスチンは、ヒトではマクロファージや好中球など免疫細胞での産生量増加が報告されていることから、レジスチンは肥満と炎症を結び付けている可能性がある。レジスチンと歯周病との関連については、現時点では我々の報告しかなく、我々はすでに好中球において、歯周病細菌由来 LPS によりレジスチン産生量の上昇を確認している。LPS は、ごく微量で脂肪組織や肝臓における脂質代謝に影響を及ぼすことが報告されており、LPS がマウスの肝臓や脂肪組織への脂肪沈着と体重増加を引き起こすことが報告されている。最近、ヒト肝細胞においてもレジスチンの発現とそのインスリン抵抗性の誘導メカニズムが報告されている。また、別のアディポカインである PAI-1 は、血液の凝集を引き起こし血栓形成と関連し、その産生量増加は動脈硬化や脳梗塞リスクを上昇させることが報告されている。ヒト破骨細胞に大腸菌由来 LPS を添加することで PAI-1 発現が上昇するとの報告もあり、歯周病における病態の進行でも同様のことが起こっているかもしれないが、歯周病原菌由来因子の関与を示す基礎的報告がほとんどないため、そのメカニズムは不明である。ヒト肝細胞と血管内皮細胞単独、またはヒト由来単球および好中球、単球系細胞との共培養条件下で、歯周病関連細菌菌体または LPS で刺激し、レジスチンや PAI-1、各種サイトカインの

発現について転写制御レベルおよび翻訳レベルでの解析を行う。レジスチンや PAI-1 の RNA 干渉および JNK、MAPK 関連抗体を用いて発現レベルを確認し、相互作用に対する影響およびシグナル伝達経路を解析し、歯周病による慢性炎症が糖代謝および動脈硬化に係するメカニズムについて明らかにできる。

2. 研究の目的

近年、歯周病は様々な全身疾患との関連が報告されている。動脈硬化、特にアテローム形成の進行と破綻の過程に、多くの炎症メディエーターが関与しているが、このうち Pentraxin3 (PTX3) は、IL-1 や TNF- α の刺激で、動脈硬化と密接な関連をもつ血管内皮細胞やマクロファージ、白血球などから直接産生され、疫学調査において歯周病との関連を示唆する報告もなされている。本研究では、ヒト由来単球系細胞において、*Poyphyromonas gingivalis* (*Pg*) 由来 LPS 刺激下での PTX3 の発現の変化を解析することで、歯周病の炎症と動脈硬化などの全身疾患との関連を明らかにすることを目的とする。本研究ではさらに、全身へ影響していると考えられる歯周病の炎症のうち、アディポカインであるレジスチンと他の炎症性サイトカインの機能を中心に明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

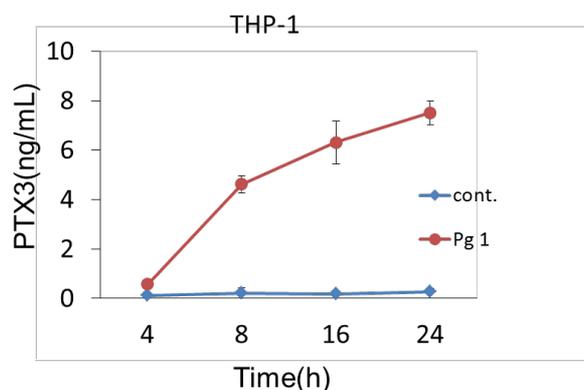
(1) ヒト単球系細胞 THP-1 を各種濃度の *P.g* 由来 LPS (Invivogen^R) および *E.coli* 由

来 LPS(WAKOR) LPS を添加し、4,8,16,24 時間培養した。培養後の細胞の培養上清を回収し、ELISA kit (Duoset ELISA Development kit : R&DR)にて PTX3 産生量の変化を調べた。通常培養および高血糖培養による培養後の細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法にて PTX3 発現を比較した。

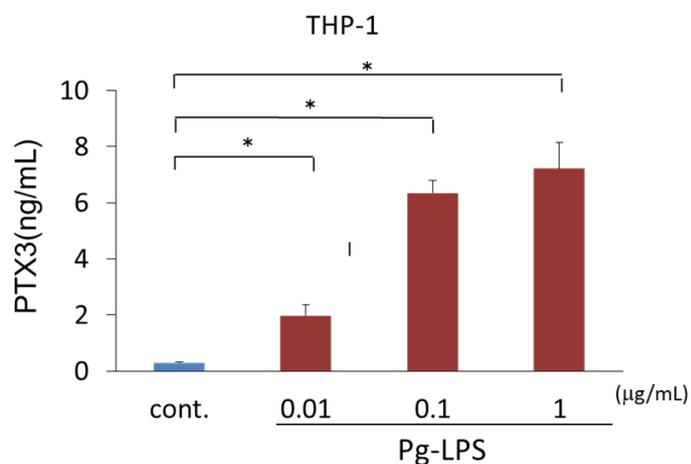
(2) ヒト肝細胞 HepG2 と血管内皮細胞 HUVEC を各種濃度の *P.g* 由来 LPS(Invivogen R) および *E.coli* 由来 LPS(WAKOR) LPS を添加し、4,8,16,24 時間培養した。培養後の細胞の培養上清を回収し、ELISA kit (Duoset ELISA Development kit : R&DR)にてレジスチンおよび PAI-1 産生量の変化を調べた。通常培養および高血糖培養による培養後の細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法にて発現を比較した。

4. 研究成果

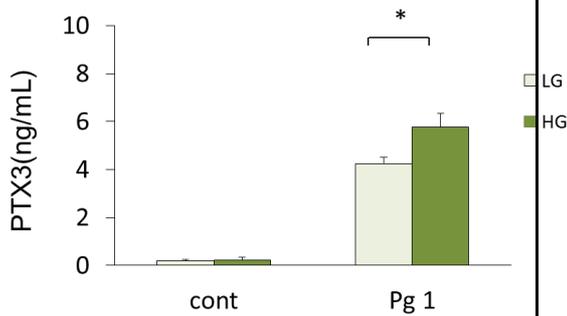
(1) 単球系細胞を Pg LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で刺激すると、8 時間培養時でコントロールと比較して有意に高い PTX3 産生を認め、24 時間培養まで上昇した。



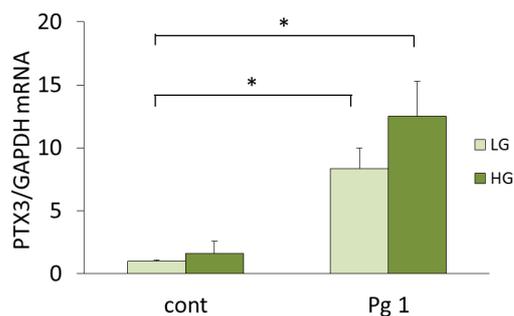
(2) Pg LPS (0.001 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で刺激すると、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時でコントロールと比較して有意に高い PTX3 産生を認め、濃度依存的に上昇した。



(3) THP-1 細胞を Pg LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で高血糖状態で刺激すると、低血糖と比較して高い PTX3 産生を認めた。



(4) THP-1細胞を高血糖培地にてPg LPS(1 μg/mL)で刺激すると、低血糖培地と比較して有意に高いPTX3発現を認めた。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Hideaki Hayashida, Toshiyuki Saito, Koji Kawasaki, Masayasu Kitamura, Reiko Furugen, et.al. : Association of periodontitis with carotid artery intima-media thickness and arterial stiffness in community-dwelling people in Japan: the Nagasaki Islands study. *Atherosclerosis*, 査読有, 229, 2013, 186-91

Reiko Furugen, Hideaki Hayashida, Toshiyuki Saito.: *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide causes resistin

release from neutrophils. *Oral Dis.* 査読有, 19, 2013, 479-83.

[学会発表] (計2件)

古堅麗子、林田秀明、齋藤俊行 : *Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激によるヒト単球系細胞における Pentraxin3 産生について 第63回日本口腔衛生学会・総会、2014年5月30日、熊本市民会館 崇城ホール、熊本市

Reiko Furugen, Hideaki Hayashida, Toshiyuki Saito: Resistin release by Lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis* via JNK and MAP kinase pathways. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and related bacterial species, August 27, 2012 Ryojun Hall, Nagasaki University Nagasaki city, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古堅 麗子 (FURUGEN, Reiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 90253674

(2) 研究分担者

齋藤 俊行 (SAITO, Toshiyuki)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：10170515

林田 秀明 (HAYASHIDA, Hideaki)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：20238140